



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **281 397 A5**

5(51) C 08 B 15/00  
 C 08 F 8/30  
 C 08 J 7/12  
 B 01 J 49/00

**PATENTAMT der DDR**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 08 B / 304 620 7

(22) 03.07.87

(44) 08.08.90

- (71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD  
 (72) Rupprich, Christian, Dipl.-Ing.; Boeden, Hans-Friedrich, Dr. rer. nat.; Henklein, Peter, Dr. rer. nat. Dip.-  
 Chem.; Büttner, Werner, Dr. rer. nat.; Becker, Manfred, Dr. rer. nat., DD  
 (73) siehe (71)

(54) Verfahren zur Aktivierung von carboxylgruppenhaltigen polymeren Verbindungen

(55) Aktivierung; carboxylgruppenhaltige polymere Verbindungen; Biotechnologie; klinische Analytik;  
 N-Chlorcarbonyloxy-5-norbornen-2,3-dicarboximid; tertiäre Amine; supernucleophile Amino  
 (57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aktivierung von carboxylgruppenhaltigen polymeren Verbindungen.  
 Anwendungsgebiet sind die chemische und pharmazeutische Industrie, die Biotechnologie und die klinische Analytik.  
 Erfindungsgemäß werden carboxylgruppenhaltige Polymere mit N-Chlorcarbonyloxy-5-norbornen-2,3-dicarboximid  
 gegebenenfalls in Gegenwart eines tertiären und eines supernucleophilen Amins umgesetzt.

ISSN 0433-6461

4 Seiten

**Patentanspruch:**

1. Verfahren zur Aktivierung von carboxylgruppenhaltigen polymeren Verbindung, dadurch gekennzeichnet, daß carboxylgruppenhaltige Polymere mit N-Chlorcarbonyloxy-5-norbornen-2,3-dicarboximid gegebenenfalls in Gegenwart eines tertiären Amins und in Gegenwart zusätzlicher katalytischer Mengen eines supernucleophilen Amins in wasserfreien organischen Lösungsmitteln bei Temperaturen von 0–100°C umgesetzt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als supernucleophiles Amin 4-Dimethylaminopyridin, 4-Pyrrolidinopyridin, N-Methylimidazol, Diazabicyclo [5.4.0] undecan, Diazabicyclo [2.2.2.] octan eingesetzt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Lösungsmittel polare organische Verbindungen wie Acetonitril, Dimethylsulfoxid, Aceton, Dioxan, Tetrahydrofuran, Pyridin u. a. oder unpolare Verbindungen wie Benzen, Toluol u. a. oder halogenierte Kohlenwasserstoffe wie Methylenchlorid, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff u. a. bzw. Gemische dieser Lösungsmittel eingesetzt werden.

**Anwendungsgebiet der Erfindung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aktivierung von carboxylgruppenhaltigen polymeren Verbindungen und daraus gebildeten Festkörperoberflächen, die für die Bindung von niedermolekularen Liganden wie Aminen, Aminosäuren und SH-gruppenhaltigen Verbindungen, Protein, Nukleinsäuren und anderen biologischen Materialien in der Biotechnologie, den Biowissenschaften und der Medizin sowie der chemischen und pharmazeutischen Industrie eingesetzt werden.

**Charakteristik des bekannten Standes der Technik**

Für die Aktivierung carboxylgruppenhaltiger polymerer Verbindungen gibt es im Gegensatz zu der Vielzahl der in der Literatur für hydroxylgruppenhaltige Matrices beschriebenen Methoden nur eine geringe Anzahl von Möglichkeiten (P. D. G. Dean, W. S. Johnson, F. A. Middle, Affinity Chromatography, IRL Press, Oxford, 1985; W. H. Scouten, Affinity Chromatography, John Wiley & Sons, New York, 1981).

Für thermisch stabile Polymere, z. B. carboxylgruppenhaltige poröse Gläser, wurde die Aktivierung mit Thionylchlorid durchgeführt (H. H. Weetall in Methods in Enzymology 44, 134 [1976]). Dabei werden die Carboxylgruppen durch überschüssiges  $\text{SOCl}_2$  in trockenem Chloroform unter Rückfluß bzw. in Gegenwart von Dimethylformamid auch bei niedrigeren Temperaturen in äußerst hydrolyseempfindliche Säurechloridgruppen überführt. Die Lagerung der aktivierten Träger soll über Phosphorpentoxid im Vakuumexsikkator erfolgen. Die Kopplung von Liganden wird überwiegend in nichtwässrigen, aprotischen Lösungsmitteln in Gegenwart tertiärer Amine durchgeführt. Für die Kopplung von Proteinen in wässrig alkalischer Lösung wird dabei die Verwendung hoher Proteinmengen vorgeschlagen. Am häufigsten ist der Einsatz von Carbodiimiden, so z. B. von Dicyclohexylcarbodiimid, für die Aktivierung carboxylgruppenhaltiger Polymerer (Carboxymethylagarose, Carboxyacrylamid u. a.) beschrieben (C. R. Lowe, M. J. Harvey, D. B. Craven, P. D. G. Dean, Biochem. J. 133, 499 [1973]; E. Brown und R. Joyeau, J. Chromatogr. 150, 111 [1978]).

Die Hauptschwierigkeiten bei der Anwendung der Carbodiimid-Methode bestehen darin, daß die entstehenden Dialkylharnstoffe wasserunlöslich sind und sich nur sehr schwer abtrennen lassen und daß die durch Umlagerung der O-Acylharnstoffe gebildeten N-Acylharnstoffe durch Bindung an der Matrix unerwünschte Eigenschaften (z. B. hydrophobe Wechselwirkungen) hervorrufen. Die Kopplung geringer Ligandmengen wird nach dieser Methode nicht empfohlen.

Für carboxylgruppenhaltige Agarose, z. B. succinylierte Aminoalkylagarose, CH-Sepharose u. a., wurde die Veresterung der Carboxylgruppen mit N-Hydroxysuccinimid unter Verwendung von Carbodiimiden zu Aktivestern angewendet (M. Robert-Gero und J. P. Waller, Eur. J. Biochem. 31, 315 [1972]). Hierbei werden jedoch auch die schon erwähnten Nachteile des Carbodiimid-Einsatzes wirksam.

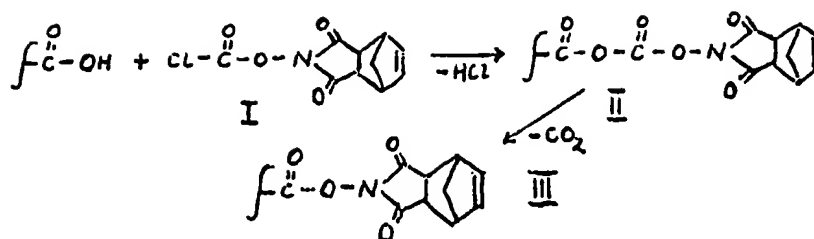
**Ziel der Erfindung**

Ziel der Erfindung ist es, ein neues Aktivierungsverfahren für carboxylgruppenhaltige polymere Verbindungen zu entwickeln.

**Darlegung des Wesens der Erfindung**

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, carboxylgruppenhaltige polymere Verbindungen so umzusetzen, daß sich reaktive Carbonsäureestergruppen bilden, die befähigt sind, mit Nucleophilen zu reagieren.

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß die carboxylgruppenhaltigen polymeren Verbindungen mit N-Chlorcarbonyloxy-5-norbornen-2,3-dicarboximid (I =  $\text{ClCOONB}$ ) in organischen Lösungsmitteln bei Temperaturen von 0–100°C, gegebenenfalls in Gegenwart von tertiären Aminen umgesetzt werden. Überraschenderweise sind die bei dieser Umsetzung gebildeten Anhydride (II) so instabil, daß sie sich unter  $\text{CO}_2$ -Abspaltung zu den entsprechenden am Träger fixierten reaktiven Carbonsäureestern (III) umsetzen.



Als carboxylgruppenhaltige Polymere können sowohl natürliche Polymere bzw. deren Derivate, wie z.B. Carboxylmethylcellulose, Carboxymethyl-Agarose oder -Sephadex, CH-Sephadex 4 B u.a. als auch synthetische Polymere, wie z.B. Carboxypolyacrylamid, Anionenaustauscher vom Typ Wofatit PS oder Wofatit CA 20 (Hersteller: VEB Chemisches Kombinat Bitterfeld) eingesetzt werden.

eingesetzt werden.

Die Reaktion des N-Chlorcarbonyloxy-5-norbornen-2,3-dicarboximids mit den carboxylgruppenhaltigen Polymeren wird in organischen Lösungsmitteln wie Dioxan, Tetrahydrofuran, Pyridin, Acetonitril, Aceton, Chloroform oder aromatischen und aliphatischen Kohlenwasserstoffen u. a. durchgeführt. Alkohole oder andere hydroxylgruppenhaltige Lösungsmittel sind ungeeignet. Gegebenenfalls erfolgt die Umsetzung in Gegenwart von tertiären Aminen, wie z. B. Triethylamin, Pyridin, N,N-Dimethylanilin usw. als HCl-Fänger. Die zusätzliche Verwendung von supernucleophilen Aminen, wie 4-Dimethylaminopyridin, 4-Pyrrolidinopyridin, N-Methylimidazol, Diazabicyclo [5.4.0]undecen, Diazabicyclo [2.2.2]octan u. a. beschleunigt die Aktivierungsreaktion. Dabei reichen schon Zusätze von katalytischen Mengen aus, um die Aktivierung bei Raumtemperatur innerhalb von 10 bis 30 Minuten abzuschließen. Die Aktivierung carboxylgruppenhaltiger Polymerer mit N-Chlorcarbonyloxy-5-norbornen-2,3-dicarboximid durch die erfindungsgemäße Einstufenreaktion führt zu relativ hohen Aktivierungsgraden (bis 400 µmol aktive Estergruppen pro Gramm trockenen Träger). Die Kopplung von niedermolekularen Liganden wie Aminen, Aminosäuren und SH-gruppenhaltigen Verbindungen, Proteinen, Nukleinsäuren und anderen biologischen Materialien kann je nach Bedarf in organischen Lösungsmitteln oder im wäßrigen Medium erfolgen, weil die aktiven Estergruppen relativ stabil sind und nur einer langsamen Hydrolyse unterliegen. In wasserfreien Lösungsmitteln bei 4°C sind die aktivierten Träger 1 Jahr ohne Aktivitätsverlust lagerbar. Die Kopplungsfähigkeit der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten aktivierten Träger wurde z. B. durch Kopplung von Glycin, Ovalbumin und Concanavalin A bewiesen.

### Ausführungsbeispiele

**Die Erfindung soll anhand folgender Beispiele erläutert werden:**

### Beispiel 1

**Beispiel 1**  
Servacel CM 52 wird durch Behandlung mit Wasser-Aceton-Gemischen steigenden Acetongehaltes und wasserfreiem Aceton entwässert.

1 g entwässertes Servacel CM 52 wird in 13 ml Dioxan aufgenommen, in welchem 16 mmol CICOONB gelöst sind. Die Umsetzung erfolgt bei 70°C unter leichtem Schütteln. Nach 5 Stunden wird die Reaktion durch Absaugen der überstehenden Lösung beendet. Der aktivierte Träger enthält 180 µmol Estergruppen/g wasserfreies Material.

Die Bestimmung der Kopplungskapazität erfolgt durch Hydrolyse des aktivierten Trägers mit 0,1 N  $\text{NH}_4\text{OH}$  und spektrophotometrische Bestimmung des abgespaltenen N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximids (HONB) bei 270 nm ( $\epsilon = 6,4 \cdot 10^4 \text{ Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### Beispiel 2

**Beispiel 2**  
Servacel CM 52 wird wie im Beispiel 1 entwässert.

Servacel CM 52 wird wie im Beispiel 1 entwässert.  
1 g entwässertes Servacel CM 52 wird in 13 ml wasserfreiem Aceton aufgenommen, in welchem 2,1 mMol  $\text{ClCOONB}$  gelöst sind. Bei 2–4°C erfolgt innerhalb von 10 Minuten unter leichtem Schütteln die portionsweise Zugabe von 2,6 mMol Triethylamin und 0,2 mMol 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) gelöst in wasserfreiem Aceton. Nach 20 Minuten wird die Reaktion beendet, die überstehende Flüssigkeit wird vom Träger abgesaugt und das aktivierte Material ausgiebig mit Aceton gewaschen. Die Kopplungskapazität beträgt 145  $\mu\text{Mol}$  Estergruppen wasserfreies Material.

### Beispiel 3

**Beispiel 5**  
Servacyl CM 52 wird wie in Beispiel 1 entwässert.

1 g entwässertes Servacel CM 52 wird in 13 ml wasserfreiem Aceton aufgenommen, in welchem 4,2 mmol ClCOONB gelöst sind. Bei 2°C–4°C erfolgt innerhalb von 10 Minuten, unter leichtem Schütteln, die portionsweise Zugabe von 5,2 mmol Triethylamin und 0,4 mmol DMAP, gelöst in wasserfreiem Aceton.

Nach 20 Minuten Reaktion beträgt die Kopplungskapazität 174 mMol Estergruppen pro Gramm wasserfreiem Material.

Nach 18 Stunden wird die Reaktion durch Absaugen des Überstandes und Waschen mit Aceton beendet.

Die Kopplungskapazität beträgt 320  $\mu\text{mol}$  Estergruppen/g wasserfreies Material.

Eine Probe des aktivierten Servacel CM 52 stufenweise mit Aceton-Wasser-Gemischen steigenden Wassergehaltes und mit Wasser behandelt.

Nach Äquilibrieren mit Natriumtetraborat-Puffer pH 8,1 wird der Träger mit Glycin umgesetzt. Die Ermittlung des kovalent gebundenen Glycins wird nach Antoni et al. (Analyt. Biochem. 129 [1983] 60-63) durch Rücktitration des nicht umgesetzten Glycins mit Trinitrobenzolsulfonsäure ermittelt.

**Kopplungskapazität: 330 µMol Glycin/g trockener Träger.**

**Beispiel 4**

Whatmancellulose CM 52 wird analog Beispiel 1 entwässert.

1 g entwässerte Whatmancellulose CM 52 wird in 13 ml wasserfreiem Aceton aufgenommen, in welchem 2,6 mMol Triethylamin und 0,2 mMol DMAP gelöst sind.

Bei Raumtemperatur erfolgt unter leichtem Schütteln innerhalb von 10 Minuten die portionsweise Zugabe von 2,1 mMol CICOONB, gelöst in wasserfreiem Aceton.

Nach 20 Minuten wird die Reaktion durch Absaugen des Überstandes und Waschen des Trägermaterials mit Aceton beendet.

Die Kopplungskapazität beträgt 400  $\mu$ Mol Estergruppen pro Gramm wasserfreies Material.

200 mg der aktivierten Whatmancellulose CM 52 werden stufenweise mit Aceton-Wasser-Gemischen steigenden Wassergehaltes und Wasser behandelt.

Das aktivierte Material wird abgesaugt und mit 20 mg Concanavalin A, gelöst in 2 ml 0,1 M Natriumtetraboratpuffer pH 8,3, zur Reaktion gebracht. Die Kopplungsreaktion wird 18 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln durchgeführt. Nach dem Entfernen von nichtgebundenem Con A durch intensives Waschen mit 0,1 M Natrium-tetraboratpuffer pH 9,3, pH 8,3 und Wasser wird der gebundene Ligand durch 1 N NaOH hydrolysiert und die Proteinmenge nach Lowry et al. (J. Biol. Chem. 193, 265 [1951]) bestimmt.

Die gebundene Con-A-Menge beträgt 38,4 mg/g trockener Träger.

**Beispiel 5**

Whatmancellulose CM 52 wird, wie in Beispiel 1 beschrieben, entwässert.

1 g Whatmancellulose CM 52 wird in 13 ml Pyridin aufgenommen, in welchem 0,2 mMol DMAP gelöst sind. Bei Raumtemperatur erfolgt unter leichtem Schütteln innerhalb von 10 Minuten die portionsweise Zugabe von 2,1 mMol CICOONB, gelöst in wasserfreiem Aceton. Nach 20 Minuten wird die Reaktion, wie in Beispiel 4 beschrieben, beendet.

Die Kopplungskapazität beträgt 54  $\mu$ Mol Estergruppen/g wasserfreies Material.

**Beispiel 6**

CM-Sephadex C-25 wird in trockenem Aceton aufgenommen und gründlich gewaschen.

Der Versuch wird gemäß Beispiel 4 durchgeführt.

Die Kopplungskapazität beträgt 30  $\mu$ Mol Estergruppen/g wasserfreies Material.

**Beispiel 7**

Wofatit CP wird in trockenem Aceton aufgenommen und gründlich gewaschen.

1 g Wofatit CP wird in 11 ml trockenem Aceton aufgenommen, in welchem 14,1 mMol CICOONB gelöst sind.

Die Umsetzung erfolgt bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln.

Nach 18 Stunden wird die Reaktion durch Absaugen des Überstandes und gründliches Waschen mit Aceton beendet.

Die Kopplungskapazität beträgt 95,0  $\mu$ Mol Estergruppen/g wasserfreies Material.

An den aktivierten Träger wird Ovalbumin gekoppelt.

Die Kopplungsreaktion und die Bestimmung der gebundenen Proteinmenge wird, wie in Beispiel 4 beschrieben, durchgeführt.

200 mg aktiviertem Wofatit CP werden 5 mg Ovalbumin, gelöst in 1 ml 0,1 M Natrium-tetraboratpuffer pH 8,3, angeboten.

Die gebundene Ovalbuminmenge beträgt 3,5 mg pro Gramm trockenes Material.

**Beispiel 8**

Wofatit CA 20 wird in trockenem Aceton aufgenommen und gründlich gewaschen.

Die Aktivierung wird analog Beispiel 7 durchgeführt.

Die Kopplungskapazität beträgt 244,0  $\mu$ Mol Estergruppen/g wasserfreies Material.

**Beispiel 9**

Wofatit CA 20 wird in trockenem Aceton aufgenommen und gründlich gewaschen.

Der Versuch wird, wie in Beispiel 4 beschrieben, durchgeführt. Anstelle von DMAP wurden 0,2 mMol N-Methylimidazol verwendet.

Die Kopplungskapazität beträgt 78,4  $\mu$ Mol Estergruppen/g wasserfreies Material.

Anzeige der Ergebnisse aus WPINDEX Datenbank  
ANSWER 1 © 2002 DERWENT INFORMATION LTD

Title

Activation of polymers contg. carboxy gps. - by reaction with 5-norbornene-2,3-di carboxy imidyl chloro-formate.

Derwent Class

A96 B04 D16

Inventor Name

BECKER, M; BOEDEN, H F; BUTTNER, W; HENKLEIN, P; RUPPRICH, C

Patent Assignee

(DEAK) AKAD WISSENSCHAFTEN DDR

Patent Information

DD 281397 A 19900808 (199102)\*

<--

Application Details

DD 281397 A DD 1987-304620 19870703

Priority Application Information

DD 1987-304620 19870703

Abstract

DD 281397 A UPAB: 19930928

Activation of COOH-contg. polymers (I) is effected by reaction with 5-norbornene-2,3-dicarboximidyl chloroformate (II) in an anhydrous organic solvent at 0-100 deg.C. (I) may be a carboxymethyl polysaccharide, hydrolysed polyacrylamide or an anion exchanger such as Wofatit PS or Wofatit CA20. The reaction is opt. effected in the presence of a tert. amine and/or a supernucleophilic amine, e.g. DMAP or DBU.

USE/ADVANTAGE - The prods. are useful as supports for immobilising amines, amino acids, thiols, proteins, nucleic acids and other biological materials for use in biotechnology, biological research, medicine and the chemical and pharmaceutical industries. The process is simple and gives reactive 5-norbornene-2,3-dicarboximidyl esters with good hydrolytic and storage stability.

0/0

Accession Number

1991-007845 [02] WPINDEX

Document Number, CPI

C1991-003466

[Go to top of page] [Go to top of page] [Go to top of page]